

外科危重病患者外周血淋巴细胞凋亡与预后的关系

林玲 蔡秀军 潘孔寒

【摘要】 目的 探讨淋巴细胞凋亡在外科危重病患者中的作用机制及其与预后的关系。方法 采用流式细胞仪分别测定外科大手术后危重病患者(39例)和正常对照组(30例)外周血淋巴细胞凋亡;采用血细胞分析仪测定淋巴细胞计数,并分析其与继发感染及重症加强治疗病房(ICU)住院时间的关系。结果 外科危重病患者淋巴细胞凋亡率高于正常对照组[(10.82±3.32)%比(2.89±1.17)%, $P<0.01$],淋巴细胞计数则显著降低[(1.41±1.26)×10⁹/L比(2.58±0.62)×10⁹/L, $P<0.01$]。与无感染组比较,继发感染组淋巴细胞凋亡率明显增强[(12.67±3.11)%比(9.24±2.63)%, $P<0.01$];入ICU后1d是否继发感染的两组患者淋巴细胞计数间差异无显著性,但3d和5d时继发感染组淋巴细胞计数则明显低于无感染组[分别为(0.68±0.35)×10⁹/L和(0.72±0.40)×10⁹/L比(1.30±1.33)×10⁹/L和(1.34±1.11)×10⁹/L],差异均有显著性(P 均 <0.05)。外科术后危重病患者的ICU住院时间与淋巴细胞凋亡率呈正相关($r=0.412$, $P=0.009$),与1、3和5d淋巴细胞计数呈负相关,与1d和5d差异均有显著性($r_1=-0.333$, $P_1=0.039$; $r_3=-0.308$, $P_3=0.057$; $r_5=-0.361$, $P_5=0.024$)。结论 外科危重病患者外周血淋巴细胞凋亡率增强、淋巴细胞计数下降,且与继发感染及ICU住院时间延长相关;有效调控淋巴细胞凋亡可能有助于改善外科术后危重病患者的预后。

【关键词】 细胞凋亡; 淋巴细胞; 预后; 危重病

Apoptosis of circulating lymphocyte in surgical critically ill patients associated with poor outcome LIN Ling*, CAI Xiu-jun, PAN Kong-han. * Intensive Care Unit, Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310016, Zhejiang, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the role and mechanism of lymphocyte apoptosis in post-operative critically ill patients and to determine the effects of lymphocyte apoptosis on the outcome of post-operative critically ill patients. **Methods** Thirty-nine consecutive post-operative patients admitted to the intensive care unit (ICU) were included in the prospective study. In addition, 30 healthy blood donors were involved for comparison. Early signs of apoptosis were investigated using flow cytometric measurement of Annexin-V binding to the cell surface of peripheral lymphocytes. In patients, absolute lymphocyte counts were measured on day 1, 3 and 5. The correlations of secondary infection and ICU stay duration with lymphocyte apoptosis and lymphocyte counts were determined. **Results** Post-operative critically ill patients exhibited higher rate of lymphocyte apoptosis than controls [(10.82±3.32)% vs. (2.89±1.17)%, $P<0.01$]. Meanwhile, lymphocyte counts were decreased significantly in patients compared with healthy individuals [(1.41±1.26)×10⁹/L vs. (2.58±0.62)×10⁹/L, $P<0.01$]. In patients group, rate of lymphocyte apoptosis was significantly higher in patients with secondary infection compared with those without secondary infection [(12.67±3.11)% vs. (9.24±2.63)%, $P<0.01$], and lymphocyte counts had no difference on day 1, while on day 3 and day 5 were decreased significantly in patients with secondary infection compared with those without secondary infection [(0.68±0.35)×10⁹/L vs. (1.30±1.33)×10⁹/L, (0.72±0.40)×10⁹/L vs. (1.34±1.11)×10⁹/L, respectively, both $P<0.05$]. ICU stay duration of post-operative patients was positively correlated with rate of lymphocyte apoptosis ($r=0.412$, $P=0.009$) and negatively correlated with day 1, 3 and 5 lymphocyte counts, significantly correlated with day 1 and day 5 ($r_1=-0.333$, $r_5=-0.361$, both $P<0.05$). **Conclusion** Lymphocyte apoptosis is enhanced in peripheral blood of post-operative critically ill patients and leads to a profound and persistent lymphopenia associated with poor outcome such as secondary infection and delay of ICU stay duration. Further studies are required to examine whether intervention to prevent lymphocyte apoptosis might alter the patients' outcome.

【Key words】 apoptosis; lymphocytes; outcome; critical illness

细胞凋亡是目前危重病领域的研究热点。近年

基金项目:浙江省教育厅科研基金资助项目(20051908)

作者单位:310016 杭州,浙江大学医学院附属邵逸夫医院ICU(林玲,潘孔寒),普外科(蔡秀军)

作者简介:林玲(1973-),女(汉族),江苏省宜兴人,医学博士,主治医师(E-mail:drllincn@yahoo.com.cn)。

来研究发现,细胞凋亡在创伤性全身炎症反应综合征(SIRS)或脓毒症发病机制中占有重要地位,与疾病的发生发展及预后密切相关^[1]。但细胞凋亡是否对外科大手术后患者也同样起作用却少有报道。本研究中通过检测外科大手术后患者外周血淋巴细胞凋亡,并分析其与继发感染及重症加强治疗病房

(ICU)住院时间的关系,以阐述淋巴细胞凋亡在外科大手术后危重病患者中的作用机制及与预后的关系,为临床治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 病例:选择 2004 年 5—7 月本院外科大手术后 ICU 住院患者,排除仅在 ICU 逗留 1 d 的外科择期手术患者和住院时已明确伴有感染的患者。39 例患者中男 29 例,女 10 例;平均年龄(56.1±15.5)岁。连续观察 10 d,根据临床有无继发感染(体温、白细胞、影像学及血培养等结果)将患者分为无感染组(21 例)和继发感染组(18 例)。选择同期 30 例健康体检者作为正常对照组,其中男 17 例,女 13 例;平均年龄(53.4±8.3)岁。

1.2 标本采集和检测方法:分别用含乙二胺四乙酸(EDTA)的真空采血管采集正常对照组和外科危重病患者(于入 ICU 后 1、3 和 5 d)的肘静脉血 5 ml,摇匀后即送检。外周血淋巴细胞凋亡检测采用流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司提供),应用钙结合蛋白 V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)染色法^[2],试剂盒由法国 Immunotech 公司提供;淋巴细胞计数测定用 STKS 血细胞分析仪(Beckman Coulter 公司)。

1.3 统计学方法:采用 SPSS10.0 统计软件包进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两样本均数间比较采用独立样本 *t* 检验,两变量相关性分析采用 Spearman 等级相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况:外科危重病患者继发感染组急性生理学与慢性健康状况评分系统 II (APACHE II) 评分为(16.8±2.8)分,无感染组 APACHE II 评分为(14.6±2.3)分;同时两组患者在年龄、性别等方面比较差异均无显著性(P 均 >0.05),具有可比性。

2.2 外科危重病患者与正常对照组淋巴细胞凋亡率和淋巴细胞计数比较(表 1):与正常对照组比较,外科危重病患者淋巴细胞凋亡率明显增强,淋巴细胞计数降低,差异均有显著性(P 均 <0.01)。

2.3 继发感染组与无感染组淋巴细胞凋亡率和淋巴细胞计数比较(表 2):继发感染组淋巴细胞凋亡率较无感染组明显增强,差异有显著性($P<0.01$);两组淋巴细胞计数在入 ICU 后 1 d 差异无显著性,3 d 和 5 d 继发感染组淋巴细胞计数明显低于无感染组,差异均有显著性(P 均 <0.05)。

2.4 外科术后危重病患者 ICU 住院时间与淋巴细

表 1 外科危重病患者与正常对照组淋巴细胞凋亡率和淋巴细胞计数的比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of lymphocyte apoptosis rate and lymphocyte counts between post-operative critically ill patients group and control group($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 例数(例) | 淋巴细胞凋亡率(%) | 淋巴细胞计数($\times 10^9/L$) |
|------------|-------|------------|---------------------------|
| 外科危重组 | 39 | 10.82±3.32 | 1.41±1.26 |
| 正常对照组 | 30 | 2.89±1.17 | 2.58±0.62 |
| <i>t</i> 值 | | 12.514 | -4.653 |
| <i>P</i> 值 | | 0.000 | 0.000 |

表 2 继发感染组与无感染组淋巴细胞凋亡率和淋巴细胞计数的比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of lymphocyte apoptosis rate and lymphocyte counts between patients with and without secondary infection($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 例数(例) | 淋巴细胞凋亡率(%) | 淋巴细胞计数($\times 10^9/L$) | | |
|------------|-------|------------|---------------------------|-----------|-----------|
| | | | 1 d | 3 d | 5 d |
| 无感染组 | 21 | 9.24±2.63 | 1.42±1.19 | 1.30±1.33 | 1.34±1.11 |
| 继发感染组 | 18 | 12.67±3.11 | 1.40±1.38 | 0.68±0.35 | 0.72±0.40 |
| <i>t</i> 值 | | -3.734 | 0.058 | 2.079 | 2.373 |
| <i>P</i> 值 | | 0.001 | 0.954 | 0.049 | 0.025 |

胞凋亡率和淋巴细胞计数的相关性分析:外科危重病患者 ICU 住院时间与淋巴细胞凋亡率呈明显正相关($r=0.412, P=0.009$);与 1、3 和 5 d 淋巴细胞计数均呈明显负相关,其中与 1 d 和 5 d 差异均有显著性($r_1=-0.333, P_1=0.039; r_3=-0.308, P_3=0.057; r_5=-0.361, P_5=0.024$)。

3 讨论

最近的研究证实,在创伤后 SIRS 或脓毒症的发生过程中,淋巴器官和外周血 T 淋巴细胞凋亡增强直接导致了免疫反应能力的下降^[1];包括中性粒细胞^[3]、巨噬细胞和淋巴细胞^[4]在内的很多免疫细胞凋亡均参与了脓毒症和多器官功能不全的病理生理过程。

本研究发现,与正常对照组比较,外科危重病患者淋巴细胞凋亡率明显增强,同时淋巴细胞计数下降。Hotchkiss 等^[4]发现,脓毒症患者中各种淋巴细胞亚群[包括 CD4、CD8 T 细胞、B 细胞及自然杀伤细胞(NK)]均出现凋亡增强,且伴有显著的 Bcl-2 水平下降。Bcl-2 是一种细胞凋亡抑制剂,可抑制经线粒体途径介导的细胞凋亡,其水平下降可引起过度的细胞凋亡。Papathanassoglou 等^[5]采用流式细胞技术检测了 35 例多器官功能不全或高危患者的外周血单核细胞,结果显示,患者 T 细胞数目显著降低,外周血单核细胞 Fas 和 FasL 表达均显著增加,并与多器官功能不全的严重程度和病死率呈显著正

相关,表明 Fas 和 FasL 基因调节紊乱所引起的免疫和炎症细胞凋亡信号改变可能是 SIRS 和多器官功能不全发生的一个重要机制,与脓毒症和多器官功能不全的发生及预后有关。本实验结果提示,淋巴细胞凋亡在外科术后危重病患者中也起作用。

目前尚不能明确淋巴细胞凋亡增强对机体是有益还是有害。淋巴细胞凋亡可能是调控致炎和代偿性抗炎因素之间平衡的重要因素。一方面,通过凋亡清除过度激活的淋巴细胞可以下调炎症反应,从而减轻器官功能不全;另一方面,合适的淋巴细胞反应能力在防御炎症中具有重要作用,广泛的淋巴细胞凋亡可能削弱宿主的防御机制,导致免疫力下降,最终将导致全身炎症反应和代偿性抗炎反应之间的失衡,引起多器官功能不全。Le Tulzo 等^[6]研究发现,脓毒性休克患者 1 d 淋巴细胞凋亡明显增强,6 d 的淋巴细胞计数下降,且与 1 d 的简明急性生理功能评分系统 II (SAPS II)、机械通气及 ICU 住院时间呈负相关。本研究结果显示,淋巴细胞凋亡率增强主要出现在术后继发感染组,并引起持续的淋巴细胞计数下降;患者 ICU 住院时间与淋巴细胞凋亡率呈正相关,与 1、3 和 5 d 淋巴细胞计数呈负相关。提示淋巴细胞凋亡可能通过导致持续的淋巴细胞计数下降,加重机体免疫抑制,从而增加 ICU 术后感染并发的危险,与预后不良密切相关。

Krautwald 等^[7]通过阻断凋亡信号路径及效应分子的作用,如天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase)抑制剂、内源性 Bcl-2 在细胞内的强制过度表达等方法,防止淋巴器官、肝脏和小肠等器官细胞凋亡增加,降低实验小鼠多器官功能不全的发生,

提高生存率。相信以抗凋亡为主的干预细胞凋亡措施必将成为危重病领域有前景的治疗手段。

综上所述,外周血淋巴细胞凋亡增强在外科术后危重病患者中具有重要作用,与其继发感染和 ICU 住院时间延长密切相关,有效调控淋巴细胞的凋亡可能有助于改善外科术后危重病患者预后,是临床治疗的一个新方向。

参考文献:

- 1 Riedemann N C, Guo R F, Ward P A, et al. The enigma of sepsis [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(4): 460-467.
- 2 Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, et al. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V [J]. *J Immunol Methods*, 1995, 184(1): 39-51.
- 3 隰建成, 周宝桐, 蒋礼先, 等. 创伤性脓毒症过程中外周血中性粒细胞凋亡的实验研究 [J]. *中国危重病急救医学*, 2005, 17(9): 561-564.
- 4 Hotchkiss R S, Osmon S B, Chang K C, et al. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways [J]. *J Immunol*, 2005, 174(8): 5110-5118.
- 5 Papathanassoglou E D, Moynihan J A, McDermott M P, et al. Expression of Fas (CD95) and Fas ligand on peripheral blood mononuclear cells in critical illness and association with multiorgan dysfunction severity and survival [J]. *Crit Care Med*, 2001(11), 29: 709-718.
- 6 Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, et al. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome [J]. *Shock*, 2002, 18(6): 487-494.
- 7 Krautwald S, Ziegler E, Tiede K, et al. Transduction of the TAT-FLIP fusion protein results in transient resistance to Fas-induced apoptosis in vivo [J]. *J Biol Chem*, 2004(42), 279: 44005-44011.

(收稿日期: 2006-10-26)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

硒在脓毒症及脓毒性休克患者重症监护治疗中的应用

最近德国学者报道了在重症监护治疗过程中应用大剂量亚硒酸钠进行辅助治疗可降低脓毒症及脓毒性休克患者的病死率。脓毒症的发生与氧自由基增加及机体抗氧化能力降低有关,于是他们认为应用大剂量的抗氧化剂(亚硒酸钠)可以改善脓毒症及脓毒性休克患者的预后。该研究采用多中心前瞻性研究方法,由德国 11 家医院的重症加强治疗病房(ICU)协作完成。该研究共纳入 249 例确诊为全身炎症反应综合征(SIRS)、脓毒症、脓毒性休克以及急性生理学与慢性健康状况评分系统 II (APACHE II)评分 > 70 分的患者。每例患者先静脉注射 1 μg 亚硒酸钠(30 min 内注射完毕),然后用维持剂量静脉滴注,连续 14 d;对照组患者按同法注射安慰剂,最后统计 28 d 病死率和患者存活时间,并进行 APACHE II 和器官功能障碍评分。另外检测血清、全血、尿中硒的含量以及血清谷胱甘肽过氧化物酶-3 的活性。其中有 11 例患者由于各种原因终止了试验,其余 238 例患者中,安慰剂组病死率为 50.0%,亚硒酸钠组为 39.7% (P=0.109)。49 例患者的资料由于不符合实验设计而在最后的统计分析时被剔除。在符合实验设计的患者中,97 例安慰剂组患者 28 d 病死率为 56.7%,92 例亚硒酸钠组患者病死率为 42.4% (P=0.049)。亚硒酸钠组发生脓毒症、弥散性血管内凝血、APACHE II 评分 > 102 分及 3 个以上器官功能障碍的患者明显少于安慰剂组。接受亚硒酸钠治疗的患者血中硒含量及谷胱甘肽过氧化物酶-3 活性均在正常范围的上限,而安慰剂组则较低。亚硒酸钠治疗过程中没有出现不良反应。因此研究者认为,应用大剂量亚硒酸钠进行辅助治疗可降低脓毒症及脓毒性休克患者的病死率。

于燕, 编译自《*Crit Care Med*》, 2006-11-06(电子版); 胡森, 审校